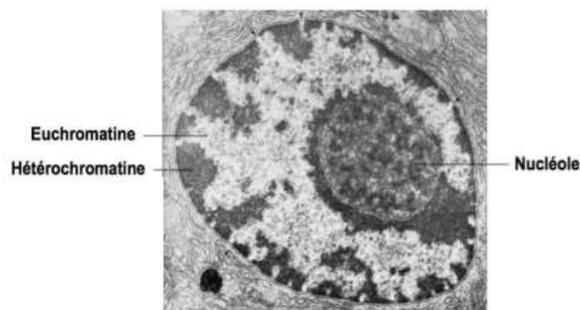


## I. Chromatine hyper condensée



Dans cette photo prise en microscopie électronique à transmission, on peut voir :

→ En blanc : les zones d'**euchromatine**

→ En noir : les zones d'**hétérochromatine** (forme extrême de chromatine hypercondensée).

→ On trouve de l'**hétérochromatine** sur la face interne de la membrane nucléaire (sauf au niveau des pores) et autour du nucléole.

→ On trouve de l'**euchromatine** au niveau des pores nucléaires mais les gènes actifs sont majoritairement retrouvés au centre du noyau, dans les endroits où il n'y a pas d'hétérochromatine.

→ Le **nucléole** apparaît noir, on pourrait croire que c'est de l'hétérochromatine mais en fait il apparaît très dense parce que le nucléole synthétise en permanence de **grandes quantités d'ARN ribosomiaux**.

→ Au niveau de ces zones d'**hétérochromatine** il y a ce qu'on appelle un **effet de position**

### A- Effet de position

#### a) Généralités

L'effet de position (ou PEV, Position Effect Variegation) se produit lorsque l'activité d'un élément génétique dépend de son contexte chromosomique, c'est-à-dire de la place qu'il occupe sur le chromosome.

→ Même si on a tous les éléments réunis pour la transcription (proximaux, distaux, code histone...), il **n'y aura pas forcément de transcription** ! En effet celle-ci dépend encore de la place que le gène occupe, **certaines emplacements sont permissifs, d'autres non**.

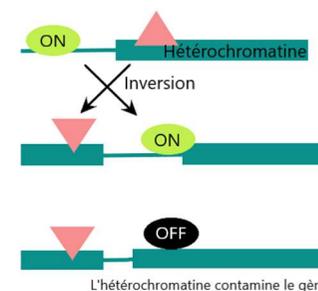
Expérience : Couleur des yeux de drosophiles

**Ici le phénotype sauvage correspond aux yeux rouges et le phénotype muté aux yeux blancs.** Cependant on nomme le gène codant pour la couleur des yeux « white », et celui-ci se situe sur le long bras du chromosome X.

On a observé des drosophiles qui avaient un œil qui n'était pas intégralement rouge comme habituellement mais qui avait **des taches blanches**. On savait que le gène *white* lorsqu'il était muté pouvait donner un œil blanc mais ici c'était seulement une partie de l'œil qui était blanc.

- Dans ces mouches là il y avait une inversion de chromosome (le haut en bas et le bas en haut) et du coup le gène *white* s'était retrouvé à proximité d'une zone d'hétérochromatine.
- L'hétérochromatine s'est propagé aux zones proches.
- Cet effet épigénétique de propagation d'hétérochromatine provoquait cette altération d'expression d'une cellule à l'autre

→ Lors de la situation classique, le gène *white* est **protégé par un insulateur** mais une fois l'inversion effectuée l'insulateur est parti de l'autre côté, le **gène *white* se trouve alors à proximité de l'hétérochromatine** et selon les cellules soit l'hétérochromatine s'est propagé soit elle ne s'est pas propagée. Donc les cellules où le gène s'exprime sont rouges, et les de cellules où le gène ne s'exprime pas sont blanches.



### b) Mutations affectant les variegations

On va avoir des mutations qui peuvent augmenter ou quasiment supprimer la variegation.

Mutation <b>supprimant</b> la variegation = <b>mutants Su(var)</b>	Ils affectent les protéines de <b>l'hétérochromatine</b> . Ainsi le gène <i>white</i> s'exprimera davantage. → On obtiendra un phénotype presque normal, œil quasi totalement <b>rouge</b> .
Mutation <b>renforçant</b> la variegation = <b>mutants En(var)</b>	En(var) pour <i>enhancer of variegation</i> , ici le gène <i>white</i> ne s'exprimera pratiquement plus. → On obtiendra un phénotype presque entièrement muté, soit un œil blanc

Les gènes **Su(var)** :

- **Sauvages**, ils codent pour des protéines de **l'hétérochromatine**
- **Mutés**, ils contrecarrent l'action de l'hétérochromatine

- **Les mutants Su(var) suppriment donc la variegation (restaurent le phénotype sauvage)**

*Schématiquement, on va dire que les gènes Su(var) codent pour de l'hétérochromatine, cependant quand ils sont défailants, c'est-à-dire mutés, ils ne fonctionnent plus aussi bien et ils ne pourront donc plus former d'hétérochromatine.*

- Ce sont par exemple les gènes :
  - **HP1** (pour Hétérochromatine Protein 1)
  - **HD** (Histone Déacétylase)
  - **Su(var)3-9** (qui méthyle la lysine en position 9 sur les histones 3)

Les gènes **En(var)** :

- **Sauvages**, ils codent pour des protéines de l'euchromatine
- **Mutés**, ils renforcent l'action de l'hétérochromatine
- **Les mutants En(var) renforcent donc la variegation (renforcent le phénotype muté)**

*Schématiquement, on va dire que les gènes En(var) codent pour de l'euchromatine, cependant quand ils sont défailants, c'est-à-dire mutés, ils ne fonctionnent plus aussi bien et ils ne pourront donc plus former d'euchromatine, favorisant donc la formation d'hétérochromatine.*

- Ce sont par exemple des gènes codant pour :
  - Les **FTs** (facteurs de transcription, on a besoin d'euchromatine pour transcrire)
  - **HAT** (Histone Acétyl Transférase)
  - **Set1** (Histone Méthyl Transférase qui méthyle l'histone H3 sur la lysine en position 4)

➔ Ces gènes facilitent l'ouverture de la chromatine et donc la transcription

#### Résumé :

Mutant Su(var) → Phénotype **sauvage**

Gène Su(var) sain → Phénotype **muté**

Mutant En(var) → Phénotype presque entièrement **muté**

Gène En(var) sain → Phénotype **sauvage**

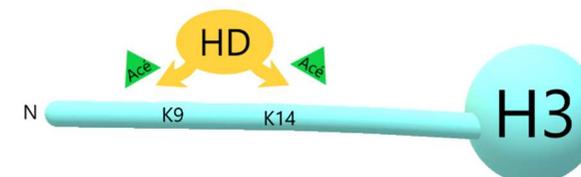
#### B- Modèle moléculaire de l'hétérochromatine

On va s'intéresser à **HP1**, une protéine motrice de la propagation de l'hétérochromatine (l'hétérochromatine empêche une expression normale des gènes, donc elle favorisera la variegation et l'inverse quand les gènes l'entraînant donc HP1 est un mutant Su(var))

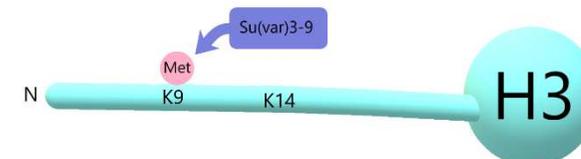
Mécanisme de formation et de propagation de l'hétérochromatine :



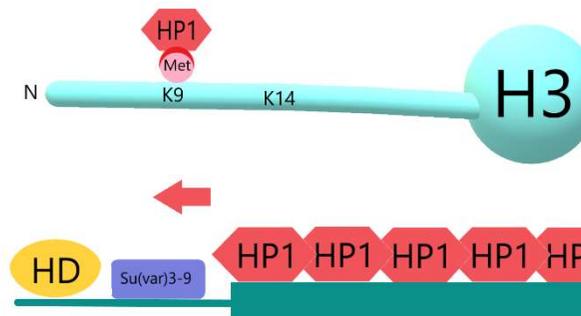
1. Avec une **Histone désacétylase (HD)**, on désacétyles les lysines 9 et 14 des queues des histones 3 (**H3K9** et **H3K14**).



2. **Su(var)3-9** méthyle ensuite la lysine 9 de l'histone 3 (**H3K9**)



3. **HP1** reconnaît la méthylation de H3K9 et vient **se fixer dessus**. HP1 interagira ensuite avec Su(var) pour continuer à se propager aux nucléosomes adjacents (**HP1 s'auto-propage**)



**HP1 reconnaît la méthylation en H3K9, s'y fixe puis s'autopropage pour former une structure hyper-condensée jusqu'à un insulateur.**



Les insulateurs limitent la propagation de la chromatine hypercondensée. Ils agissent comme des frontières qui empêchent cette propagation (c'est un phénomène important de régulation).

### C- Les facteurs de transcription

Certains FTs vont être capables d'ouvrir la chromatine hyper-condensée.

Expérience : Couleur des yeux de drosophiles

On prend un système artificiel où on a introduit dans une cellule 256 sites de fixation de **Lacl**, une protéine bactérienne qui intervient au niveau de l'opéron lactose (qui n'existe donc pas chez l'homme).

On va avoir 2 protéines, **GFP-Lacl** et **GFP-Lacl-VP16**, VP16 étant un activateur de la transcription.

On remarque que la **GFP-Lacl** est condensée dans **le noyau**. Elle se fixe mais reste au niveau du même espace nucléaire, car les cellules ont tendance à condenser les séquences répétées (ici les 256 sites de fixations Lacl)

Lorsqu'on rajoute le **VP16** (qui ouvre la chromatine en recrutant des facteurs de remodelage), le **GFP-Lacl-VP16** s'étend.

➔ En fonction de ce qui se fixe dessus, un domaine d'ADN peut être **condensé** ou au contraire **étalé** dans le noyau.

On voit que **les zones de transcription** colocalisent avec les zones où se trouve **GFP-Lacl-VP16**.

En traitant à l'**alpha-magnétine**, on fait **disparaître la transcription** mais la chromatine reste quand même **ouverte**.

➔ L'alpha-magnétine va donc **bloquer uniquement la transcription** et pas la **décondensation liée à VP16**.

### Résumé :

#### Gène inactif :

- **H3 K9** méthylée
- Chromatine **dense**
- Domaines insensibles à la DNase = 90% de notre génome

#### Gène compétent :

- **H3/H4 acétylées**
- Fibre de **30nm**
- Condensation intermédiaire
- **Pas de transcription** mais prêt à l'emploi
- **Sensible à la DNase1** mais sans site hypersensible

#### Gène actif :

- **H3/H4 acétylées**
- **H3 K4** méthylée
- Fibre de **11nm transcrite**
- **Sensible à la DNase1**
- Sites hypersensibles = 10% de notre génome

### D- Chromatine et différenciation

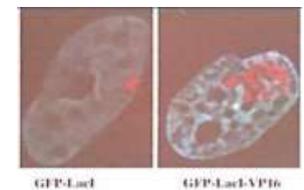
**+ une cellule est différenciée, + elle aura d'hétérochromatine**

Une cellule qui est à son état maximum de différenciation va exprimer bien moins de gène qu'une cellule non différenciée.

Expérience : érythroblaste

Dans le proérythroblaste, on a peu d'hétérochromatine qui se concentre en périphérie.

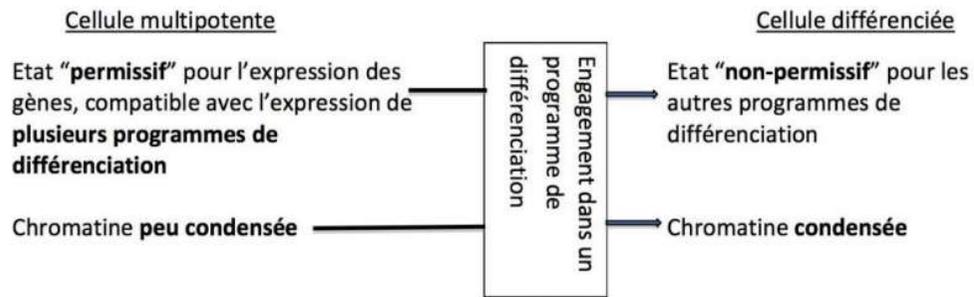
Dans la même cellule, mais plus différenciée, l'érythroblaste, l'euchromatine laisse sa place à l'hétérochromatine qui est donc très importante.



Une cellule qui sera plus proche de son état souche gardera une certaine souplesse de son génome, elle a différents potentiels et peut donc être amenée à se différencier dans des voies différentes

➔ L'hétérochromatine va se former petit à petit par mesure de « sécurité » afin d'éviter que la cellule ne revienne en arrière dans sa différenciation

**La quantité de chromatine hyper-condensée augmente avec la différenciation**



**NB :** En cas de cancer, la cellule différenciée va se **déprogrammer**, les zones d'hétérochromatine sont en partie détruites, ce qui va contribuer à la dérégulation de la cellule qui retourne à un état de type progéniteur/souche.

## I. Positionnement spatial des gènes

### A- Organisation nucléaire

#### L'organisation nucléaire est liée à l'expression des gènes

La localisation spatiale des gènes actifs, compétents et inactifs est importante pour le programme transcriptionnel.

L'hétérochromatine est souvent retrouvée à la **périphérie** et dans le **nucléole**.

#### Le nucléole :

- Est très visible en MO et en ME
- Il n'a pas de membrane mais est très structuré
- C'est le centre de synthèse des ARNr
- Le nucléole est une usine à transcription mais uniquement pour l'**ADN ribosomiaux**, qui code pour les ARNr ribosomiaux. Les ARNr seront ensuite assemblés en pré-ribosomes dans le nucléole.

#### Dans l'hétérochromatine périphérique :

- On trouve les gènes **inactifs** (H3K9 méthylés)

#### Dans les zones d'euchromatine, on retrouve :

- Les gènes **actifs** (acétylation +H3K4 méthylé)
- Les gènes **compétents** (acétylation)
- Les **corps de Cajal** (corps pelotonnés) = assemblage de **spliceosomes** et **activation de la télomérase**.

- Les **corps PML** = fonction **d'assemblage** de certaines protéines du noyau qui interviennent dans la régulation du devenir cellulaire, l'apoptose, la sénescence...

#### Les granules interchromatiniennes :

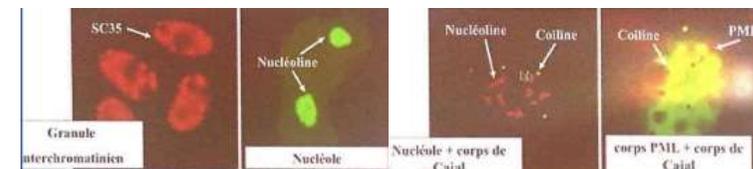
- 20-25 nm
- Près de l'**euchromatine**
- Site de **stockage des spliceosomes** (ensemble des complexes **ARN/protéine** organisant l'**épissage** des transcrits)

La compartimentation au sein du noyau est importante dans l'expression des gènes.

On peut utiliser des **marqueurs spécifiques** à chaque élément :

- **Les granules interchromatiniennes** sont marquées par **SC35** (rouge)
- **Le nucléole** par la **nucléoline**
- **Les corps de Cajal** par la **coïline** (vert)
- **Les corps PML** par la **protéine PML**

On peut aussi **co-visualiser** plusieurs corps nucléaires.



### B- Position spatiale des gènes

L'**hétérochromatine** tapisse la **face interne** de la membrane nucléaire, elle apparaît dense en microscopie. Cependant, on a des « trous » dans l'hétérochromatine au niveau des **pores nucléaires** qui permettent le trafic nucléo-cytoplasmique.

**L'espace nucléaire ≠ l'espace occupé par les gènes**

#### a) Phénomène de trans-inactivation

Chez la drosophile, il faut savoir qu'il existe des **appariements somatiques** (beaucoup **plus rare chez l'Homme**), c'est à dire que **des chromosomes homologues viennent s'apparier notamment lors de l'interphase** ! Normalement ça ne se passe que dans les cellules germinales pour la méiose, et bien là, ça se passe dans une cellule somatique.

On prend 2 chromosomes homologues à une chromatide, dans une cellule somatique de drosophile :

- On étudie le gène **brown** (responsable de la couleur de la mouche), présent sous la forme de 2 allèles (1/K)
- Maintenant on prend l'un des 2 allèles du gène brown (sur 1 des K) et on insère au milieu de cet allèle une portion d'hétérochromatine, 10 mégabases.
- On a complètement inactivé cet allèle.

→ Normalement ce n'est pas trop grave, quand on fait ç sur des gènes récessifs, l'autre version du gène compense vu qu'il est fonctionnel.

Mais ici on observera un phénomène **muté** (aucun des gènes brown ne fonctionne).

Les K homologues s'apparient, et ici, l'allèle brown avec l'hétérochromatine va influencer l'allèle sauvage qui se trouve sur le K homologue. Et la chromatine au sein de cet allèle va se répandre et aller condenser l'allèle sauvage d'en face.

→ Normalement, l'influence se déroule sur un même chromosome, mais ici l'hétérochromatine s'est propagée sur **un autre chromosome** (on appelle ça un phénomène de **trans-activation**, trans parce que sur un autre K).

#### b) Localisation des gènes inactifs

L'hétérochromatine se situe à la **périphérie du noyau** dans l'espace **périnucléolaire**. Mais l'hétérochromatine est **impliquée** dans la régulation des autres gènes.

Expérience : Ikaros

Des chercheurs étudiaient la différenciation des lymphocytes B à travers la fonction d'une famille de facteurs de différenciation appelés **facteurs Ikaros**. Ces facteurs ont pour rôle d'entraîner, durant la différenciation, les gènes qui doivent rester inactifs à **proximité de l'hétérochromatine** (Ikaros donne des ailes aux gènes qui doivent être inactifs pour les apporter proches de l'hétérochromatine). Ceci a pour conséquence de bloquer l'expression de ces gènes → **l'hétérochromatine influence son entourage**.

Au cours du processus de différenciation, il y a donc des processus spécifiques de stockage des gènes, avec **la modification des localisations** permettant l'établissement d'un **programme transcriptionnel stable**.

**Le positionnement spatial est utilisé comme une information de régulation de l'expression des gènes**

#### c) Localisation des gènes qui s'expriment

Ils sont minoritaires.

On utilise des expériences de marquage pour voir que ces gènes sont plutôt localisés **au centre** du noyau, au niveau de **l'euchromatine**. On y retrouve les **gènes actifs** (acétylation + H3K4 méthylée), ainsi que les **gènes compétents** (acétylation).

#### d) Structure de la chromatine et territoires chromosomiques

Les territoires chromosomiques sont un niveau d'organisation de la chromatine. C'est le dernier endroit encore « explorable » que nous étudions. *Chaque chromosome est représenté en double dans une cellule somatique et occupe une position particulière visible en interphase*. Grâce à des sondes fluorescentes de différentes couleurs, spécifiques de chacun des chromosomes → c'est **l'hybridation in situ**, le **sky FISH** ou encore le **M-FISH**.

**Les chromosomes ont des territoires attribués les uns par rapports aux autres.**

Il y a 2 niveaux de visualisation :

- L'hybridation, qui reflète un certain niveau de compaction de cet ADN chromosomique
- En visualisant de plus près, on peut voir les territoires. C'est une structure **dynamique** qui peut aussi se décondenser. On peut aussi voir de manière schématique une boucle, plutôt périphérique des domaines.

**90% des gènes** sont **inactifs**, donc ils sont dans un état un peu condensé. Quand on a besoin d'activer un gène, toute une série d'événements vont se produire, mais l'événement final consistera à sortir le gène de cette pelote, du territoire chromosomique.

**La transcription se fera à la périphérie des territoires.**

Ces territoires sont le dernier niveau d'organisation de l'expression des gènes, extrêmement fonctionnelle.